

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/EP05/001567

International filing date: 16 February 2005 (16.02.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: DE
Number: 10 2004 008 449.1
Filing date: 16 February 2004 (16.02.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 20 April 2005 (20.04.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse



Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

Aktenzeichen: 10 2004 008 449.1

Anmeldetag: 16. Februar 2004

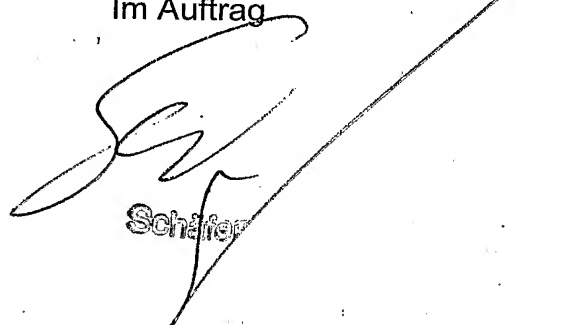
Anmelder/Inhaber: ProteoSys AG, 55129 Mainz/DE

Bezeichnung: Diagnostische Marker für Krebs

IPC: C 12 Q 1/533

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 10. März 2005
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag



Schäfer

Anmelderin: ProteoSys AG
Carl-Zeiss-Straße 51

55129 Mainz

Unser Zeichen: P 43 831 DE

16. Februar 2004 TM/GS/nw

Beschreibung

Diagnostische Marker für Krebs

Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung verschiedener Protei-
ne als diagnostische Marker für Krebs, die Verwendung von Wirkstoffen
5 zur Behandlung von Krebs sowie diesbezügliche pharmazeutische Zu-
sammensetzungen und Kits.

Krebserkrankungen sind im allgemeinen durch die Entstehung von ei-
nem oder mehreren Tumoren gekennzeichnet. Unter Tumor wird eine
10 Geschwulst bzw. die örtlich umschriebene Zunahme des Gewebevolu-
mens verstanden. Im weiteren Sinne kann jede lokalisierte Anschwel-
lung, z. B. durch ein Ödem, einer akuten und chronischen Entzündung,
aneurysmatische Erweiterung, einer entzündlich bedingten Organ-
15 schwellung (z. B. als sogenannter Milztumor) verstanden werden. Im
engeren Sinne werden unter Tumor gewebliche Neubildungen (Ge-
wächs, Plastom, Neoplasie) in Form eines spontanen, verschiedengra-
dig enthemmten, autonomen und irreversiblen Überschußwachstums
von körpereigenem Gewebe, das in der Regel mit unterschiedlich aus-
20 geprägtem Verlust spezifischer Zell- und Gewebefunktion verbunden ist,
verstanden.

Die Tumore werden zur besseren Klassifikation unterteilt in:

I. nach ihrem biologischen Verhalten:

1. benigne (gutartige) Tumore mit differenzierten Zellen und langsamen, lokal verdrängendem Wachstum.
2. maligne (bösartige) Tumore mit Zellkernpolymorphie, Zellatypie, Anaplasie und infiltrierendem, meist raschem, destruierendem Wachstum und Metastasierung.
3. semimaligne Tumore mit den histologischen Kennzeichen maligner Tumore und lokal infiltrierendem Wachstum, jedoch in der Regel ohne eine Metastasierung.

II. histogenetische Systematik:

Hierbei werden die Tumore klassifiziert anhand des Gewebes, aus dem sie entwicklungsgeschichtlich hervorgegangen sind. Es gibt:

1. epitheliale Tumore, die aus Ektoderm und Entoderm hervorgegangen sind:
 - a) benigne Tumore wie z. B. Adenom, Papillom und Polypen.
 - b) maligne Tumore wie z. B. Karzinom.
2. mesenchymale Tumore, hervorgegangen aus dem Mesoderm:
 - a) benigne Tumore wie z. B. Lipom, Fibrom, Osteom, Myom, Leiomyom, Rhabdomyom, Chondrom,
 - b) maligne Tumore wie z. B. die Sarkome.
3. embryonale Tumore sind aus undifferenziertem Gewebe hervorgegangen. Hierzu zählen z. B. Neuroblastome, Medulloblastome, Reti-

noblastome sowie embryonale Rhabdomyosarkome und Teratome.

III. Klassifikation nach klinischen und pathologischen Befunden:

5 Unter anderem gelten hier die TNM-Klassifikation, Grading, Laurén-Klassifikation, Dukes-Klassifikation, Kieler-Klassifikation, Rappaport-Klassifikation etc.

10 Schon diese kurze Übersicht der Tumoreinteilung zeigt, welche Vielfalt (und zum Teil Gegensätzlichkeit) innerhalb der verschiedenen Tumorarten besteht. So ist z. B. nicht nur zwischen benignen und malignen Tumoren zu unterscheiden, sondern auch zwischen Mortalität bzw. Letalität der einzelnen Tumore und die Wahrscheinlichkeit, daß sich ein benigner Tumor zu einem malignen Tumor weiterentwickelt.

15 Einzelne Tumore wie z. B. die Mamakarzinome (Brustkrebs), der häufigste maligne Tumor der Frau, treten gehäuft vor allem zwischen dem 45. und 70. Lebensjahr auf. Frühsymptome sind verdächtige Tastbefunde, die in der Regel infolge der Krebsfrüherkennungsuntersuchungen
20 sowie bei regelmäßiger Selbstuntersuchung der Brust entdeckt werden. Abhängig von Tumorstadium und Differenzierungsgrad des Tumors kann dabei die Prognose von durchaus positiv bis sehr schlecht ausfallen. Infolge der frühen lymphogenen und hämatogenen Metastasierung bei Mammakarzinomen kommt es auf eine rasche Diagnostizierung des
25 Tumors an, um frühestmöglich mit der Therapie einsetzen zu können.

Prostatakarzinome (Karzinom der Prostata) ist demgegenüber der häufigste maligne Tumor des Mannes, der vor allem zwischen dem 50. und 70. Lebensjahr auftritt. In der Mehrzahl handelt es sich dabei um Adenokarzinome. Dieser maligne Tumor breitet sich durch infiltrierendes
30 Wachstum zunächst innerhalb der Prostata aus, später erfolgt eine Infiltration von Bläschendrüsen und Beckenbindegewebe, relativ selten auch

von Rektum, Harnblase oder Urethra. Die Metastasierung erfolgt lymphogen und/oder hämatogen. Die Therapie erfolgt abhängig vom histologischen Differenzierungsgrad und klinischen Stadium in der Regel durch radikale Prostatektomie mit regionaler Lymphknotenausräumung, im fortgeschrittenen Stadium Entzug der männlichen Sexualhormone. Auch hierbei ist die Prognose abhängig vom Stadium des Karzinoms. Während in einem sehr frühen Stadium nach einer radikalen Prostatektomie in ca. 90 % der Fälle eine Heilung eintritt, ist bei fortgeschrittenem Stadium eher mit einer pessimistischen Prognose zu rechnen.

10

Prostatakarzinome sind von Prostatahyperplasie in der Diagnose zu unterscheiden. Bei der Prostatahyperplasie handelt es sich um einen benignen, also gutartigen Tumor. Dabei vergrößert sich die Prostata durch numerische Zunahme der Zellen und Drüsen des Stromas. Die Prostatahyperplasie ist die häufigste Ursache von Blasenentleerungsstörungen bei Männern. Klinisch beginnt sie vor allem zwischen dem 40. und 50. Lebensjahr. Der Verlauf ist langsam und schubweise. Das Auftreten von Beschwerden erfolgt dabei meistens erst nach Jahren mit allmählicher Abschwächung des Harnstrahls und verzögertem Miktionsbeginn. Hierbei kann als Therapie bzw. Linderung der Symptomatik die Verabreichung von Phytotherapeutika in Betracht gezogen werden.

20

25

30

Da generell eine frühe Erkennung, d. h. Diagnostizierung, der Tumore für den raschen Therapiebeginn wichtig ist und auch die Prognose um so besser ist, je früher der Tumor erkannt wird, sind eine Reihe von sogenannten Tumormarkern im klinischen Einsatz. Als Tumormarker werden dabei allgemein Substanzen und zelluläre Veränderungen bezeichnet, deren qualitative oder quantitative Analyse eine Aussage über Vorliegen, Verlauf oder Prognose von (bösartigen) Erkrankungen ermöglichen kann. Eingeteilt werden Tumormarker in:

1. Zelluläre Tumormarker:

Darunter fallen unter anderem zellmembranständige Tumorantigene, Rezeptoren (z. B. Hormonrezeptoren, Rezeptoren für wachstumsfördernde Substanzen bei Leukämie) und Zellmarker, die auf eine vermehrte Expression von Onkogenen und ein monoklonales Zellwachstum hindeuten, sowie molekulargenetische zelluläre Veränderungen, vor allem Chromosomenaberrationen.

2. Humorale Tumormarker:

Diese sind gegenüber physiologischen Bedingungen in Körperproben, insbesondere in Serum, Urin und anderen Körperflüssigkeiten in erhöhten Konzentrationen nachweisbare (meist physiologisch vorkommende) Substanzen, die vom Tumorgewebe synthetisiert und/oder sezerniert, durch Tumorzerfall freigesetzt oder als Reaktion des Organismus auf einen Tumor gebildet werden. Die physiologische Bedeutung von Tumormarkern ist nur unzureichend bekannt. Im menschlichen Organismus wirken sie in der Regel nicht immunogen. Die klinische (diagnostische) Bedeutung ist abhängig von ihrer Spezifität und Sensitivität. Die humoralen Tumormarker werden in zwei Gruppen unterteilt. In der ersten Gruppe werden die humoralen Tumormarker zusammengefaßt, die vom Tumor selbst produziert werden. Darunter fallen z. B. tumorassoziierte Antigene, bestimmte Hormone (z. B. Gastrin, Cortisol etc.), Enzyme (z. B. neuron-spezifische Enolase (NSE)), sowie Proteine (z. B. Bence-Jones-Protein). In der zweiten Gruppe sind die Tumormarker enthalten, die vom Tumor zwar induziert, aber nicht selbst produziert werden. Wichtige humorale Tumormarker dieser Gruppe sind z. B. alkalische Phosphatase (AP), LDH, Neopterin etc.

Die bisher gemachten Aussagen zeigen, wie wichtig selektive und sensitive Nachweisverfahren für Tumore sind. Weiterhin besteht ein großer Bedarf an neuen Targets bei der Tumor- bzw. Krebstherapie.

- 5 Dementsprechend stellt sich die Erfindung die Aufgabe, neue diagnostische Marker für Krebserkrankungen sowie neue Angriffspunkte und Wirkstoffe für die Krebstherapie bereitzustellen.

- 10 Diese Aufgabe wird durch die Gegenstände der unabhängigen Ansprüche gelöst. Bevorzugte Ausführungsformen sind in den abhängigen Ansprüchen genannt. Der Wortlaut sämtlicher Ansprüche wird hiermit durch Bezugnahme zum Inhalt der Beschreibung gemacht.

- 15 Es konnten durch intensive vergleichende Analysen zwischen bösartig entartetem Gewebe (Krebsgewebe) und nicht entartetem Gewebe verschiedene Proteine identifiziert werden, die sich bei diesen Gewebearten in ihrer Häufigkeit bzw. Konzentration (Abundanz) signifikant unterscheiden. Die charakteristische Abundanz eines bestimmten Proteins im Vergleich mit Kontrollen stellt daher ein wichtiges Indiz für das Vorhandensein von entartetem Zellwachstum, also Krebsgewebe, dar. Erfindungsgemäß werden diese Proteine als diagnostische Marker für Krebs verwendet.

- 25 Zur Identifizierung dieser Proteine wurden Proben aus Krebsgewebe (Prostatakrebs) und nicht-entartetem Gewebe (gutartige Prostatahyperplasia (BPH)) aufbereitet und die beiden Proben jeweils mit verschiedenen Isotopen markiert. Die Proben wurden zusammengemischt und gemeinsam auf einem zweidimensionalen Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Die Signale jedes Isotops wurden getrennt detektiert und die entsprechenden Proteinspots weiter analysiert. Mit dieser Vorgehensweise konnten verschiedene Proteine identifiziert werden, die sich in ihrer Häufigkeit im Krebsgewebe deutlich von der Häufigkeit im

gutartigen Gewebe unterscheiden. Die verschiedenen Proteine sind hierbei zum Teil in Krebsgewebe deutlich häufiger vorhanden, also heraufreguliert, und zum Teil deutlich weniger vorhanden, also herabreguliert.

5

Die Erfindung umfaßt zunächst die Verwendung des Proteins Ubiquitin-Isopeptidase T und/oder des Proteins Protein-Disulfid-Isomerase (PDI) als diagnostische Marker für Krebs. Hierbei wird vorteilhafterweise eine Herabregulation der Ubiquitin-Isopeptidase T und/oder eine Heraufregulation der Protein-Disulfid-Isomerase (PDI) im Vergleich mit Kontrollen als charakteristisches Merkmal für Krebsgewebe herangezogen. Die Erfinder konnten zeigen, daß die Ubiquitin-Isopeptidase T etwa 5 x weniger abundant in Krebsgewebe und die PDI etwa doppelt so hoch in Krebsgewebe im Vergleich mit gutartigem Gewebe exprimiert wird. Hier zeigt sich eine inverse Korrelation zwischen PDI und Ubiquitin-Isopeptidase T.

10

15

20

25

30

Die Ubiquitin-Isopeptidase T ist ein Enzym, welches neben anderen Enzymen an der Ubiquitin-abhängigen Proteolyse von Proteinen beteiligt ist. Nach Addition einer Polyubiquitin-Kette an das Zielprotein wird das ubiquitinierte Protein durch einen Komplex, bestehend aus vielen Untereinheiten, der als 26 S-Proteasom bekannt ist, abgebaut. Die nachfolgende Ablösung der Polyubiquitin-Kette wird durch das zinkbindende Enzym Ubiquitin-Isopeptidase T vermittelt. Ebenso wie die Ubiquitin-Isopeptidase T ist auch die PDI an der kontrollierten Proteolyse von Proteinen, also an apoptotischen Prozessen, beteiligt. PDI wechselwirkt im endoplasmatischen Retikulum unter bestimmten Bedingungen mit Ubiquilin, welches eine Ubiquitin-artige Domäne und eine Ubiquitin-assoziierte Domäne aufweist. Diese Assoziation wurde bereits in einen funktionellen Zusammenhang mit der Erlangung einer Toleranz gegenüber ischemischem Streß und Apoptose gestellt (Ko H. S. et al., 2002, J. Biol. Chem. 277: 35386-92).

Diese Beziehung hinsichtlich apoptotischen Prozessen zwischen beiden Enzymen macht eine Beobachtung der Herab- bzw. Heraufregulation beider Proteine als charakteristisches Merkmal für Krebsgewebe besonders geeignet. Andererseits ist es auch vorteilhaft, wenn nur eines dieser Proteine, insbesondere die Ubiquitin-Isopeptidase T, in der Abundanz als diagnostisches Merkmal analysiert wird. Dies ist besonders vorteilhaft, da die Ubiquitin-Isopeptidase T in ihrer Häufigkeit in Krebsgewebe verglichen mit Kontrollen sehr deutlich, d. h. auf etwa ein Fünftel, reduziert ist.

Weiterhin umfaßt die Erfindung die Verwendung der mitochondrialen Enoyl-Coenzym A-Hydratase, des Fettsäure-bindenden Proteins 3 (FABP-3) und/oder des epidermalen Fettsäure-bindenden Proteins (E-FABP) als diagnostische Marker für Krebs. Besonders bevorzugt ist es hierbei, wenn eine Heraufregulation der mitochondrialen Enoyl-Coenzym A-Hydratase und/oder des epidermalen Fettsäure-bindenden Proteins (E-FABP) und/oder eine Herabregulation des Fettsäure-bindenden Proteins 3 (FABP-3) im Vergleich mit Kontrollen untersucht wird, da sich erfindungsgemäß eine solche Herauf- bzw. Herabregulation dieser Proteine als charakteristisches Merkmal für Krebsgewebe herausgestellt hat.

Die Erfinder konnten zeigen, daß die mitochondriale Enoyl-Coenzym A-Hydratase in Krebsgewebe etwa 2,8-fach in ihrer Abundanz erhöht ist. Dieses Enzym wurde bereits im Zusammenhang mit der β -Oxidation von Fettsäuren beschrieben, welche vorwiegend in den Mitochondrien abläuft. Dieser Zusammenhang mit dem Fettsäuremetabolismus stellt einen funktionellen Zusammenhang der Enoyl-Coenzym A-Hydratase mit FABP-3 und E-FABP her. Auch diese Fettsäure-bindenden Proteine sind in ihrer Abundanz in Krebsgewebe in charakteristischer Weise verändert. Hierbei ist FABP-3 etwa 2,5-fach herunterreguliert und E-FABP et-

- wa 2,3-fach heraufreguliert. Neben dem Zusammenhang mit Fettsäuren wurde für FABP-3 eine Rolle bei der Zellzykluskontrolle beschrieben (Seidita G. et al, 2000, Carcinogenesis 21: 2203-10). E-FABP wurde bereits im Zusammenhang mit verschiedenen Arten von Krebs beschrieben und konnte im Urin von Krebspatienten nachgewiesen werden (Brouard M. C. et al., 2002, Melanoma-Research 12: 627-31). Die von den Erfindern beobachtete erhöhte Abundanz dieses Proteins macht es insbesondere in Kombination mit den anderen beiden Markern mitochondriale Enoyl-Coenzym A-Hydratase und/oder FABP-3 als diagnostischen Marker für Krebs in besonderer Weise geeignet, da hier zwischen diesen verschiedenen Proteinen ein funktioneller Zusammenhang besteht. Es können jeweils also eines dieser Proteine oder besonders vorteilhaft zwei oder drei dieser Proteine in ihrer Abundanz im Vergleich mit Kontrollen beobachtet werden, so daß durch die charakteristische Herauf- bzw. Herabregulation dieser Proteine Rückschlüsse auf das Vorliegen von Krebsgewebe gemacht werden können. Der Zusammenhang mit dem Fettsäuremetabolismus trifft auch noch auf weitere der hier beschriebenen Proteine zu, wie weiter unten ausgeführt wird.
- Weiterhin umfaßt die Erfindung die Verwendung des Proteins Serum-Amyloid P-Komponente (SAP) als diagnostischen Marker für Krebs. Die Erfinder konnten zeigen, daß dieses Protein in Krebsgewebe etwa um das 2,7-fache in seiner Häufigkeit erniedrigt ist. Die Untersuchung der Herabregulation von SAP im Vergleich mit Kontrollen ist daher in besonderer Weise als charakteristisches Merkmal für Krebsgewebe geeignet. SAP ist ein Lektin-artiges Akutphasenprotein der Pentraxin-Familie. Die Pentraxine sind durch Cytokine induzierbar und steigen in ihrer Konzentration im Blut bei Infektionen oder Trauma dramatisch an.
- Weiterhin umfaßt die Erfindung die Verwendung des Proteins 14-3-3 Protein tau als diagnostischen Marker für Krebs. Dieses Protein ist bekanntermaßen an apoptotischen Vorgängen beteiligt. Weiterhin wurde

dieses Protein bereits auch im Zusammenhang mit Krebs beschrieben. Hierbei wurde allerdings eine Anti-Onkogenizität festgestellt (He H., 1997, Gan-To-Kagaku-Ryoho 24: 1448-53). Demgegenüber konnte von den Erfindern nun überraschenderweise ein erhöhter Level (1,8-fach)
5 von 14-3-3 Protein tau in Krebsgewebe festgestellt werden. Erfindungsgemäß wird daher eine Heraufregulation des Proteins im Vergleich mit Kontrollen als charakteristisches Merkmal für Krebsgewebe untersucht.

Weiterhin umfaßt die Erfindung die Verwendung des Proteins nukleäres
10 Chloridionenkanal-Protein als diagnostischen Marker für Krebs. Diesbezüglich konnten die Erfinder eine etwa 1,5-fache Erhöhung der Abundanz dieses Proteins in Krebsgewebe verglichen mit Kontrollen feststellen. Somit wird vorzugsweise eine Heraufregulation dieses Proteins im Vergleich mit Kontrollen als charakteristisches Merkmal für Krebsgewe-
15 be untersucht. Dieser intrazelluläre Anionenkanal wurde bereits im Zusammenhang mit Zellteilung und Apoptose beschrieben (Ashley R. H., 2003, Mol. Membr. Biol. 20: 1-11).

Weiterhin umfasst die Erfindung die Verwendung des Proteins Annexin,
20 insbesondere Annexin A3, als diagnostischen Marker für Krebs. Die Erfinder konnten zeigen, dass dieses Protein in bestimmten Patientengruppen in Krebsgewebe 5-fach heraufreguliert ist. Daher wird vorzugsweise eine Heraufregulation dieses Proteins im Vergleich mit Kontrollen als charakteristisches Merkmal für Krebsgewebe untersucht. Die Anne-
25 xine sind eine Familie von strukturell verwandten Proteinen, die Phospholipide in Abhängigkeit von Kalzium binden. Die genaue Rolle der Annexine ist bislang jedoch unklar.

Weiterhin umfaßt die Erfindung die Verwendung von mindestens einem
30 der folgenden Proteine als diagnostischen Marker für Krebs: Ubiquitin-Isopeptidase T, Serum-Amyloid P-Komponente (SAP), Fettsäurebindendes Protein 3 (FABP-3), Galektin, Mikroseminoprotein beta, Hitze-

schockprotein 27 (HSP27), 14-3-3 Protein beta, 14-3-3 Protein zeta, nukleäres Chloridionenkanal-Protein (CLIC-1), 14-3-3 Protein tau, Hitzeschockprotein 90 (HSP90), Protein-Disulfid-Isomerase (PDI), epidermales Fettsäure-bindendes Protein (E-FABP), mitochondriale Enoyl-Coenzym A-Hydratase, Nucleophosmin, Annexin, insbesondere Annexin A3, Transgelin, Triosephosphat-Isomerase und Aldolase A. Besonders bevorzugt ist es, wenn eine Herabregulation von mindestens einem der Proteine Ubiquitin-Isopeptidase T, Serum-Amyloid P-Komponente (SAP), Fettsäure-bindendes Protein 3 (FABP-3), Galektin, Mikrosemionoprotein beta, Hitzeschockprotein 27 (HSP27) oder Transgelin im Vergleich mit Kontrollen untersucht wird. Weiterhin ist es bevorzugt, wenn zusätzlich oder als Alternative hierzu eine Heraufregulation von mindestens einem der folgenden Proteine im Vergleich mit Kontrollen untersucht wird: 14-3-3 Protein beta, 14-3-3 Protein zeta, nukleäres Chloridionenkanal-Protein (CLIC-1), 14-3-3 Protein tau, Hitzeschockprotein 90 (HSP90), Protein-Disulfid-Isomerase (PDI), epidermales Fettsäure-bindendes Protein (E-FABP), mitochondriale Enoyl-Coenzym A-Hydratase, Nucleophosmin, Annexin, insbesondere Annexin A3, Triosephosphat-Isomerase und Aldolase A.

Erfindungsgemäß konnte gezeigt werden, daß diese verschiedenen Proteine in charakteristischer Weise in Krebsgewebe im Vergleich mit gutartigem Gewebe herunter- bzw. heraufreguliert sind. Einzelheiten hierzu ergeben sich aus der folgenden Tabelle 1. Hierin wird die Identifizierung und die Quantifizierung der verschiedenen Proteine in gutartigem und bösartigem Gewebe zusammengefaßt. Die Auswahl der Proteine basiert auf einer statistisch signifikanten differentiellen Expression der Proteine in gutartigem (benigne Fraktion) und bösartigem (Krebsfraktion) Gewebe. Die *Accession Number* entspricht der jeweiligen Nummer aus der NCBI-Datenbank. Das theoretische Molekulargewicht (MW) ist das Molekulargewicht, das gemäß den Datenbanksequenzen errechnet wurde. Unter „scores“ sind die mit Hilfe der MASCOT-Technik ermittelten Tref-

fer zu verstehen. Die Angabe zum PMF-Score bezieht sich auf den Mowse-Score, der vom MASCOT-Server verwendet wird, wobei im allgemeinen ein PMF-Score, der höher als 65 ist, eine signifikante Identifizierung repräsentiert. Die letzten zwei Spalten fassen die Quantifizierung der Proteinspot-Intensitäten zusammen, die für die gutartigen und bösartigen Gewebefractionen gefunden wurden.

No	AccNo	Beschreibung	theor. MW	PMF Score	benigne Fraktion	Krebs-fraktion
1	gi 1732411	isopeptidase T [Homo sapiens]	94104	115	83.6	16.4
2	gi 576259	Chain A; Serum Amyloid P Component (Sap)	23598	106	73.1	26.9
3	gi 494781	Fatty Acid Binding Protein (Holo Form, Human Muscle) (M-Fabp)	14775	87	71.6	28.4
4	gi 4504981	beta-galactosidase binding lectin precursor; Lectin; galactose-binding; soluble; 1; galectin [Homo sapiens]	15769	177	66.2	33.8
5	gi 225159	microseminoprotein beta	12238	92	63.9	36.1
6		n.i.			60.6	39.4
7	gi 662841	heat shock protein 27 [Homo sapiens]	22667	182	60.2	39.8
8	gi 4507949	tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, beta polypeptide; 14-3-3 pr	27946	160	41.2	58.8
9	gi 4507953	tyrosine 3/tryptophan 5 -monooxygenase activation protein, zeta polypeptide; protein kinase C inhib	27810	160	41.1	58.9
10	gi 2073569	nuclear chloride ion channel protein [Homo sapiens]	27249	139	40.1	59.9
11		n.i.			39.5	60.5
12		n.i.			37.4	62.6
13	gi 5803227	tyrosine 3/tryptophan 5 -monooxygenase activation protein, theta polypeptide, 14-3-3 protein tau	28032	130	35.6	64.4
14	gi 13129150	heat shock 90kDa protein 1, alpha, heat shock 90kD protein 1, alpha [Homo sapiens]	85006	147	32.6	67.4
	gi 20149594	heat shock 90kDa protein 1, beta, heat shock 90kD protein 1, beta, Heat-shock 90kD protein-1, beta	83554	164		
15	gi 20070125	prolyl 4-hydroxylase, beta subunit, v-erb-a avian erythroblastic Leukaemia viral oncogene homolog 2	57480	235	31.2	68.8
16	gi 4557581	(NM_001444) fatty acid binding protein 5 (psoriasis-associated); E-FABP [Homo sapiens]	15497	94	27.9	72.1
17	gi 12707570	mitochondrial short-chain enoyl-coenzyme A hydratase 1 precursor [Homo sapiens]	31807	101	26.2	73.8
18	gi 16307090	Similar to nucleophosmin (nucleolar phosphoprotein B23, numatrin) [Homo sapiens]	29617	77	21.9	78.1

Im folgenden wird eine Zusammenstellung der englischsprachigen Synonyme für diese verschiedenen Proteine aufgelistet. Hierbei entspricht

die vorangestellte Nummer der Numerierung in der Tabelle 1. An erster Stelle steht jeweils die in der übrigen Beschreibung gewählte deutsche Bezeichnung dieser Proteine.

- 5 1. gi|1732411: **Ubiquitin-Isopeptidase T**; Isopeptidase T (isoT); ubiquitin specific protease 5; Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 5; Ubiquitin thiolesterase 5; Ubiquitin-specific processing protease 5; Deubiquitinating enzyme 5 ; de-ubiquitinase.
- 10 2. gi|576259: **Serum-Amyloid P-Komponente**; Chain A; Serum Amyloid P Component (SAP).
3. gi|494781: **Fettsäure-bindendes Protein 3 (FABP-3)**; Mammary-derived growth inhibitor (MDGI); fatty acid binding protein 3 (FABP-3);
- 15 Heart-Type Fatty Acid Binding Protein (H-FABP); Muscle-Type Fatty Acid Binding Protein (M-Fabp).
4. gi|4504981: **Galektin**; galectin-1; 14 kDa beta-galactoside-binding lectin; beta galactoside soluble lectin; Beta-galactoside-binding lectin L-14-
- 20 l; Galaptin; soluble galactoside-binding lectin; S-Lac lectin 1.
5. gi|225159: **Mikrosemينoprotein beta**; beta-microseminoprotein; microseminoprotein beta; Immunoglobulin binding factor (IGBF); PN44; Prostate secreted seminal plasma protein; Prostate secretory protein of
- 25 94 amino acids (PSP-94); Seminal plasma beta-inhibin; seminal plasma protein.
- 6.: nicht identifiziert
- 30 7. gi| 662841: **Hitzeschockprotein 27 (HSP27)**; heat shock protein 27; 27kDa heat shock protein 1 (HSP-27); Stress-responsive protein 27 (SRP27); Estrogen-regulated 24 kDa protein; 28 kDa heat shock protein.

8. gi|4507949: **14-3-3 Protein beta**; 14-3-3 protein beta (14-3-3 beta); 14-3-3 protein alpha (14-3-3 alpha); Protein kinase C inhibitor protein-1; PKC inhibitor protein-1 (KCIP-1: auch 14-3-3 zeta); RNH-1.

5

9. gi|4507953: **14-3-3 Protein zeta**; 14-3-3 zeta; 14-3-3 delta; KCIP-1 (auch 14-3-3 beta); YWHAZ; mitochondrial import stimulation factor S1 (MSF S1); Factor activating exoenzyme S; tryptophan monooxygenase activation protein zeta; tyrosine monooxygenase activation protein zeta.

10

10. gi|2073569: **nukleäres Chloridionenkanal-Protein**; chloride intracellular channel 1 (CLIC-1); nuclear chloride ion channel protein (p64CLCP); nuclear chloride channel; chloride channel ABP; Nuclear chloride ion channel 27 (NCC27); RNCC protein; Nuclear chloride ion channel 27 (NCC27).

15

11.: nicht identifiziert

12.: nicht identifiziert

20

13. gi| 5803227: **14-3-3 Protein tau**; 14-3-3 tau; 14-3-3 theta; S15076 protein kinase regulator 14-3-3; HS1; tryptophan 5 -monooxygenase activation protein; tyrosine 3 -monooxygenase activation protein.

14. gi|13129150: **Hitzeschockprotein 90 (HSP90)**; Heat shock protein 90 (HSP-90); Heat shock protein HSP 90-alpha; heat shock protein 90-alpha; 90 kDa heat-shock protein; heat shock protein 86 (HSP 86); Hspca; heat shock 90kDa protein 1; heat shock protein 1; Tumor specific transplantation 86 kDa antigen (TSTA).

30

15. gi|20070125: **Protein-Disulfid-Isomerase (PDI)**; protein disulfide isomerase (PDI); Prolyl-4-hydroxylase beta; protein disulfide oxidore-

ductase; thyroid hormone binding protein p55; glutathione insulin trans-hydrogenase.

16. gi|4557581: **epidermales Fettsäure-bindendes Protein (E-FABP)**;
5 Fatty acid binding protein 5 (FABP-5); epidermal fatty acid-binding protein (E-FABP); Psoriasis-associated fatty acid-binding protein (PA-FABP); cutaneous fatty acid-binding protein (C-FABP); keratinocyte lipid binding protein (KLBP); DA11.
- 10 17. gi|12707570: **mitochondriale Enoyl-Coenzym A-Hydratase**; Mitochondrial Enoyl Coenzyme A hydratase; Mitochondrial enoyl-CoA hydratase; short-chain enoyl-CoA hydratase, mitochondrial; short-chain enoyl-coenzyme A hydratase (SCEH).
- 15 18. gi|16307090: **Nukleophosmin**; Nucleophosmin; nucleolar phosphoprotein B23; Nucleolar protein NO38; numatrin; NPM(1).

- Darüber hinaus konnten noch vier weitere Proteine identifiziert werden, die jeweils in Krebsgewebe verglichen mit Kontrollgewebe in bestimmten
20 Patientengruppen heraufreguliert bzw. herabreguliert sind. Und zwar handelt es sich hierbei um die Proteine Annexin A3, Transgelin, Triosephosphat-Isomerase und Aldolase A. Annexin A3 wird in Krebsgewebe etwa 5-fach heraufreguliert und Transgelin wird etwa 5-fach herabreguliert. Triosephosphat-Isomerase und Aldolase A wird jeweils in Krebs-
25 gewebe heraufreguliert.

Die englischsprachigen Synonyme für Annexin A3 und Transgelin lauten folgendermaßen:

- 30 19. gi|4826643: **Annexin A3**; Annexin III; lipocortin III; anticoagulant protein III; Placental anticoagulant protein III (PAP III); 35 alpha calcimedin.

20. gi|4507359: **Transgelin**; SM22-alpha smooth muscle protein, 22 kDa actin-binding protein, Smooth muscle 22 protein, Actin-associated protein p27, 25 kDa F-actin-binding protein.

- 5 Zusätzlich wurden noch weitere Proteine identifiziert, die im Vergleich von Krebsgewebe mit Kontrollgewebe in bestimmten Patientengruppen abweichende Abundanz zeigten. Bei diesen Proteinen handelt es sich um ATP-Synthase, Biliverdin-Reduktase B, Glucose-reguliertes Protein, Prolyl 4-Hydroxylase beta und dnak-artiges molekulares Chaperone.
- 10 Und zwar ist die ATP-Synthase herabreguliert und die übrigen dieser Proteine sind heraufreguliert.

Interessanterweise weisen viele der identifizierten Proteine eine Beziehung zum Lipidmetabolismus auf. Für Annexin A3 und SAP wurde eine

15 direkte Bindung an Lipide beschrieben. Beide Proteine sind an phagozytotischen Vorgängen beteiligt. Mit FABP-3 und E-FABP wurden zwei Fettsäure-bindende Proteine identifiziert. Die mitochondriale Enoyl-Coenzym A-Hydratase ist an der β -Oxidation von Fettsäuren beteiligt. Die Aktivität von HSP27 wird durch die Aktivität der Protein-Kinase C

20 stimuliert, die selbst durch die Aktivität von Phospholipasen beeinflusst wird, welche Phospholipide umsetzen. Auch HSP90 beeinflusst den Phospholipid-Stoffwechsel, da eine Inhibierung von HSP90 in einem veränderten Phospholipid-Metabolismus resultiert (Chung Y. L. et al., 2003, J. Natl. Cancer Inst. 95: 1624-33). Weiterhin ist PDI vermutlich

25 ebenfalls mit dem Lipid-Metabolismus verknüpft, da PDI als ein multifunktionales Protein wirkt, welches u.a. am Triglycerid-Transfer beteiligt ist (Horiuchi R. and Yamauchi K., 1994, Nippon-Rinsho 52: 890-5). Darüberhinaus hemmen die 14-3-3 Proteine die Aktivität der Protein-Kinase C und enthalten konservierte Sequenzen, die der Pseudosubstrat-

30 Domäne der Protein-Kinase C und dem C-Terminus der Annexine ähneln. Dies deutet alles darauf hin, dass eine funktionelle Beziehung zwischen diesen verschiedenen Proteinen besteht.

Mit den erfindungsgemäß verwendeten diagnostischen Markern können verschiedene Arten von Tumoren und Krebserkrankungen nachgewiesen werden. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform der Erfindung handelt es sich bei der zu diagnostizierenden Krebserkrankung um Prostatakrebs, insbesondere um ein Prostatakarzinom. Wie schon eingangs erwähnt, stellen Prostatakarzinome die häufigsten malignen Tumore bei Männern dar. Nur wenn ein Prostatatumor in einem frühen Stadium nachgewiesen werden kann, kann eine vorbeugende chirurgische Entnahme der Prostata eine erfolgversprechende Therapie sein. Für die fortgeschrittene, nicht mehr auf ein Organ begrenzte Erkrankung ist eine vorbeugende Entnahme der Prostata nicht mehr ausreichend. Für diese zum Teil inoperativen Prostatatumore kann eine Hemmung der männlichen Sexualhormone in Betracht gezogen werden. Eine solche Hemmung, vorzugsweise in Kombination mit einer chirurgischen oder pharmakologischen Kastration, inhibiert zum Teil die Proliferation und Metastasierung des Tumors und erlaubt damit dessen Kontrolle für einen gewissen Zeitraum. Die meisten Prostatatumore entwickeln allerdings mit der Zeit eine gewisse Resistenz gegenüber dieser endokrinologischen Therapie. Andere Therapiemöglichkeiten, wie z. B. die Verwendung von cytotoxischen Agenzien, Gentherapie oder Immunotherapie befinden sich in der klinischen Erprobung, konnten bisher leider noch keinen durchschlagenden Erfolg erzielen. Dies macht es erforderlich, daß ein Prostatakrebs möglichst in einem sehr frühen Stadium erkannt wird, so daß dann noch mit Erfolg chirurgisch behandelt werden kann. Die beschriebenen, erfindungsgemäßen diagnostischen Markerproteine sind mit großen Vorteil zur Früherkennung von Prostatakrebs geeignet.

Bei der erfindungsgemäßen Verwendung der beschriebenen Proteine als diagnostische Marker können verschiedene Methoden eingesetzt werden, um die Häufigkeit bzw. Abundanz der Proteine in Krebsgewebe (bzw. in zu untersuchendem Gewebe) im Vergleich mit Kontrollgewebe

zu analysieren. Besonders vorteilhaft ist es, wenn die Proteine der zu untersuchenden Probe und der Kontrollprobe gelelektrophoretisch aufgetrennt werden, beispielsweise auf einem üblichen Polyacrylamidgel. Anschließend wird die Abundanz der jeweiligen Proteine in Probe und

5 Kontrolle miteinander verglichen. Wegen der erforderlichen Auflösung sind hierbei vor allem zweidimensionale Gele bevorzugt. Andererseits ist es auch möglich, vor der gelelektrophoretischen Auftrennung eine Vorreinigung vorzunehmen, so daß auch beispielsweise mit einer eindimensionalen Polyacrylamid-Gelelektrophorese eine ausreichende Auftren-

10 nung und Analysierbarkeit erreicht wird. Auch andere Methoden zur Auftrennung von Proteinen können mit Vorteil eingesetzt werden, beispielsweise übliche chromatographische Methoden, insbesondere säulenchromatographische Methoden. Besonders vorteilhaft ist es, wenn die zu untersuchende Probe und die Kontrollprobe auf unterschiedliche

15 Weise markiert wird, beispielsweise durch verschiedene Isotope. Hierdurch wird ein Vergleich der zu untersuchenden Probe mit der Kontrolle in Bezug auf die Abundanz der jeweiligen Proteine erleichtert. In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform werden die zu analysierenden Proteine massenspektrometrisch untersucht, um eine genaue Identifizierung der Proteine zu ermöglichen.

20

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform werden die zu untersuchenden Proteine mit Hilfe von Antikörpern qualitativ und quantitativ charakterisiert. Hierbei können polyklonale und/oder monoklonale Antikörper eingesetzt werden, die gegen die jeweils zu untersuchenden Proteine, die als diagnostische Marker verwendet werden, gerichtet sind. Zum qualitativen und vor allem quantitativen Nachweis können übliche Immunoassays eingesetzt werden, wie beispielsweise herkömmliche *enzym-linked immunosorbent assays* (ELISA).

25

30

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform erfolgt der qualitative und quantitative Nachweis der diagnostischen Markerproteine mit Hilfe

von Oligonukleotiden, die beispielsweise im Zuge einer üblichen Polymerasekettenreaktion (PCR) eingesetzt werden können. Hierbei handelt es sich um ein molekulargenetisches Verfahren, bei dem selektiv bestimmte DNA-Abschnitte oder auch RNA-Abschnitte amplifiziert werden.

- 5 Hierdurch kann ein qualitativer und auch quantitativer Nachweis der zu untersuchenden Proteine auf DNA- bzw. RNA-Ebene erfolgen. Weiterhin können mit geeigneten Oligonukleotiden sogenannte Hybridisierungsversuche durch beispielsweise herkömmliche Northern- oder Southern-Blots durchgeführt werden, wodurch ebenfalls qualitative und quantitative
- 10 Aussagen zu den Proteinen auf RNA- oder DNA-Ebene gemacht werden können. Der Vorteil dieser Nachweismethoden mit Oligonukleotiden liegt in der guten Automatisierbarkeit dieser Vorgehensweisen. Andererseits muß auch berücksichtigt werden, daß hierdurch nicht zwangsläufig Aussagen über die eigentliche Abundanz des Proteins
- 15 gemacht werden, sondern lediglich Aussagen zur Häufigkeit der entsprechenden DNA- bzw. RNA-Abschnitte. In diesem Fall muß also vorab geklärt werden, ob die charakteristische Herab- bzw. Heraufregulation der jeweiligen diagnostischen Markerproteine beispielsweise auf mRNA-Ebene erfolgt, oder ob die Regulierung auf einer der Transkription nach-
- 20 geschalteten Ebene bewerkstelligt wird.

- Die erfindungsgemäß festgestellte charakteristische Veränderung der Abundanz der verschiedenen Proteine gegenüber Kontrollgeweben wirkt sich insbesondere auch auf die Aktivität der jeweiligen Proteine, beispielsweise auf deren enzymatische Aktivität, aus. Daher ist es weiterhin
- 25 bevorzugt, daß neben der Untersuchung der Abundanz oder als Alternative dazu die Aktivität der jeweiligen Proteine bestimmt wird und mit Kontrollen verglichen wird. Auch dies ist unter der Herauf- bzw. Herabregulation der verschiedenen Proteine zu verstehen. Eine entsprechende
- 30 Untersuchung kann beispielsweise durch übliche enzymatische Tests erfolgen, die sich für die jeweiligen Proteine dem Fachmann erschließen. Weiterhin können beispielsweise im Fall der Fettsäure-bindenden

Proteine entsprechende Bindungsassays oder vergleichbares durchgeführt werden, um so Erkenntnisse über die Aktivität bzw. die Herauf- oder Herabregulation dieser Proteine zu gewinnen. Ähnliches gilt auch für die anderen Proteine. Beispielsweise können bestimmte Kanalaktivitäten gemessen werden, um Aussagen über das nukleäre Chloridionenkanal-Protein machen zu können. Dies kann für die Verwendung der verschiedenen Proteine als diagnostische Marker bzw. den im folgenden beschriebenen erfindungsgemäßen Diagnosekit ausgenutzt werden. Weiterhin kann eine derartige Messung der Aktivität der jeweiligen Proteine durchgeführt werden, um die Wirkung eines Wirkstoffs zu testen, der erfindungsgemäß zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung von Krebs verwendet wird, wie nachfolgend beschrieben wird.

Weiterhin umfaßt die Erfindung einen Diagnosekit, welcher mindestens eine Substanz zum Nachweis der Aktivität und/oder Expression von mindestens einem der beschriebenen Proteine umfaßt, welche als diagnostische Marker gemäß der obigen Beschreibung verwendet werden. Vor allem dient ein solcher Diagnosekit dazu, die jeweilige Abundanz von mindestens einem dieser Proteine zu bestimmen, die gegenüber Kontrollen in charakteristischer Weise in Krebsgewebe herauf- oder herunterreguliert ist. Die Abundanz spiegelt hierbei in erster Linie die Expression des Protein wider. Der erfindungsgemäße Diagnosekit ist in vorteilhafter Weise zur Erkennung oder zum Screening von Krebserkrankungen, insbesondere von Prostatakrebs, geeignet, wobei hierdurch in besonders vorteilhafter Weise eine Früherkennung solcher Krankheiten ermöglicht wird. Beispielsweise kann mit einem solchen Diagnosekit oder mit der erfindungsgemäßen Verwendung der beschriebenen Markerproteine auch zwischen gutartigem und bösartigem Gewebe unterschieden werden, beispielsweise zwischen benignem Prostatahyperplasia-Gewebe und Prostatakrebsgewebe. Bevorzugterweise enthält ein solcher Diagnosekit einen oder mehrere Antikörper oder ein oder mehrere Oligonukleotide bzw. Oligonukleotidpaare, die mit einem oder mehre-

ren der beschriebenen Proteine bzw. der entsprechenden Nukleinsäuren wechselwirken. Mit Hilfe dieser Substanzen können somit qualitative und vor allem quantitative Aussagen zu diesen Proteinen im Vergleich mit Kontrollen getroffen werden.

5

Die zu untersuchenden Proben und die Kontrollproben stammen im allgemeinen aus dem Körper eines Patienten, wobei beispielsweise Gewebeproben oder auch Proben aus Körperflüssigkeiten, wie beispielsweise Blut, Serum, Lymphflüssigkeit oder Urin, entnommen und in der für einen Fachmann geläufigen Weise aufbereitet werden. Besonders vorteilhaft ist es, wenn potentiell bösartiges Gewebe, also das zu untersuchende Gewebe, und Kontrollgewebe, also gutartiges Gewebe, aus dem selben Patienten entnommen werden und direkt miteinander verglichen werden. Andererseits ist es auch möglich, die Abundanz der jeweiligen Proteine mit anderen Standards zu vergleichen, die beispielsweise aus einer Vielzahl von unabhängigen Kontrollproben statistisch ermittelt werden. Im Fall von Prostatakrebs wird vorteilhafterweise benignes und potentiell malignes Prostatagewebe aus einem Patienten entnommen, der einer Prostatektomie unterzogen wird. Bei dem Kontrollgewebe kann es sich beispielsweise um gutartiges Prostatahyperplasia-Gewebe handeln.

Die Erfindung umfaßt ferner ein Verfahren zur Diagnose von Krebserkrankungen, wobei mindestens eines der beschriebenen Proteine in seiner Abundanz und/oder Aktivität analysiert wird. Durch die Analyse der erfindungsgemäß festgestellten Herab- bzw. Heraufregulation dieser Proteine in Krebsgewebe können aus diesen Untersuchungsergebnissen Rückschlüsse für das Vorliegen von Krebsgewebe gezogen werden. Bezüglich weiterer Merkmale dieses erfindungsgemäßen Verfahrens wird auf die obige Beschreibung verwiesen.

- Weiterhin umfaßt die Erfindung die Verwendung von mindestens einem Wirkstoff, der die Aktivität und/oder Expression des Proteins Ubiquitin-Isopeptidase T und/oder die Aktivität und/oder die Expression der Protein-Disulfid-Isomerase (PDI) beeinflußt, zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung von Krebs. Wie bereits beschrieben, ist die Häufigkeit bzw. Abundanz dieser Proteine in Krebsgewebe in charakteristischer Weise verändert. Insbesondere ist die Abundanz der Ubiquitin-Isopeptidase T deutlich erniedrigt und die Abundanz der Protein-Disulfid-Isomerase (PDI) erhöht. Die Beeinflussung der Expression bzw. der Aktivität dieser Proteine hin zu dem normalen Maß, wie es beispielsweise in Kontrollgeweben verwirklicht ist, stellt daher einen Therapieansatz zur Behandlung von Krebserkrankungen dar. Es wird daher zum einen die Verwendung eines Wirkstoffs beansprucht, der die Aktivität und/oder die Expression der Ubiquitin-Isopeptidase T steigert. Zum anderen wird die Verwendung eines Wirkstoffs beansprucht, der die Aktivität und/oder die Expression der PDI hemmt. Durch derartige Wirkstoffe wird die Aktivität der erwähnten Proteine auf das übliche Maß reguliert, wodurch eine Krebserkrankung wirksam behandelt werden kann.
- Weiterhin umfaßt die Erfindung die Verwendung von mindestens einem Wirkstoff, der die Aktivität und/oder Expression der mitochondrialen Enoyl-Coenzym A-Hydratase, des Fettsäure-bindenden Proteins 3 (FABP-3) und/oder des epidermalen Fettsäure-bindenden Proteins (E-FAPB) beeinflußt, zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung von Krebs. Hierbei ist es bevorzugt, wenn ein hemmender Wirkstoff für die Aktivität und/oder Expression der mitochondrialen Enoyl-Coenzym A-Hydratase und/oder des E-FABP bzw. ein steigernder Wirkstoff für die Aktivität und/oder Expression des FABP-3 eingesetzt wird.
- Weiterhin umfaßt die Erfindung die Verwendung von mindestens einem Wirkstoff, der die Aktivität und/oder Expression der Serum-Amyloid P-

Komponente (SAP) beeinflusst, insbesondere steigert, zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung von Krebs.

Weiterhin umfaßt die Erfindung die Verwendung von mindestens einem
5 Wirkstoff, der die Aktivität und/oder Expression des Proteins 14-3-3 Protein tau beeinflusst, vorzugsweise hemmt, zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung von Krebs.

Weiterhin umfaßt die Erfindung die Verwendung von mindestens einem
10 Wirkstoff, der die Aktivität und/oder Expression des nukleären Chloridionenkanal-Proteins beeinflusst, vorzugsweise hemmt, zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung von Krebs.

Weiterhin umfaßt die Erfindung die Verwendung von mindestens einem
15 Wirkstoff, der die Aktivität und/oder Expression von Annexin, insbesondere von Annexin A3, beeinflusst, vorzugsweise hemmt, zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung von Krebs.

Darüber hinaus umfaßt die Erfindung die Verwendung von mindestens
20 einem Wirkstoff, der die Aktivität und/oder Expression von mindestens einem der folgenden Proteine beeinflusst, insbesondere steigert, zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung von Krebs: Ubiquitin-Isopeptidase T, Serum-Amyloid P-Komponente (SAP), Fettsäure-bindendes Protein 3 (FABP-3), Galektin, Mikrosemipoprotein beta, Hitzeschockprotein 27 (HSP27) und Transgelin. Darüber hinaus umfaßt die
25 Erfindung die Verwendung von mindestens einem Wirkstoff, der die Aktivität und/oder Expression von mindestens einem der folgenden Proteine beeinflusst, vorzugsweise hemmt, zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung von Krebs: 14-3-3 Protein beta, 14-3-3 Protein zeta,
30 nukleäres Chloridionenkanal-Protein, 14-3-3 Protein tau, Hitzeschockprotein 90 (HSP90), Protein-Disulfid-Isomerase (PDI), epidermales Fettsäure-bindendes Protein (E-FABP), mitochondriale Enoyl-Coenzym A-

Hydratase, Nucleophosmin, Annexin, insbesondere Annexin A3, Triosephosphat-Isomerase und Aldolase A.

- Bei allen diesen Proteinen wurde erfindungsgemäß gezeigt, daß sie in charakteristischer Weise in Krebsgewebe im Vergleich mit Kontrollzellen herauf- bzw. herabreguliert werden. Daher wird es erfindungsgemäß beansprucht, diese Proteine in jeweils entgegengesetzter Weise durch entsprechende Wirkstoffe herab- bzw. heraufzuregulieren, um so die Aktivitäten, insbesondere die enzymatischen Aktivitäten, von gesunden Kontrollgeweben zu erreichen. Hierdurch können verschiedene Krebserkrankungen erfolgreich behandelt werden. Besonders bevorzugt ist hierbei die Herstellung von Medikamenten zur Behandlung von Prostatakrebs.
- Bei den erfindungsgemäß eingesetzten Wirkstoffen kann es sich beispielsweise um Peptide, Proteine, sogenannte *small molecular compounds* oder Polynukleotide handeln. Hierbei kann es sich jeweils um bekannte Wirkstoffe handeln, die die Aktivität und/oder Expression der verschiedenen Proteine in bekannter Weise beeinflussen, oder es kann sich um neue Wirkstoffe handeln. Diese Wirkstoffe können direkt an den beschriebenen Proteinen angreifen. Andererseits kann es auch bevorzugt sein, wenn diese Wirkstoffe Regulatoren, insbesondere Aktivatoren oder Inhibitoren, und/oder biologische Vorläufer dieser verschiedenen Proteine beeinflussen. Je nachdem, ob bei der Beeinflussung durch den Wirkstoff eine Hemmung oder eine Steigerung der Aktivität und/oder der Expression des jeweiligen Proteins bevorzugt ist, kann es sich bei dem Wirkstoff um einen Agonisten oder einen Antagonisten handeln. Als Antagonisten kommen beispielsweise hemmende Antikörper in Frage, die die Aktivität des jeweiligen Proteins vermindern oder blockieren können.
- Weitere Beispiele für antagonistisch wirkende Wirkstoffe sind *deficient*-Mutanten oder *dominant-negative*-Mutanten, die durch molekularbiologische Methoden konstruierbar sind. Sie sind beispielsweise enzymatisch

inaktiv, konkurrieren jedoch mit dem jeweiligen Substrat des zu hemmenden Proteins oder Enzyms, so daß die Aktivität des Proteins im Ergebnis herabgesetzt wird. Ein weiteres Beispiel für einen antagonistisch wirkenden Wirkstoff sind *antisense*-Moleküle, die in bekannter Weise die Expression eines bestimmten Proteins herabsetzen können. Als agonistisch wirksame Substanzen können beispielsweise Substanzen eingesetzt werden, die die Expression eines bestimmten Gens bzw. die Umsetzung von mRNA in das aktive Genprodukt fördern. Hierbei kann es sich beispielsweise um spezifische Transkriptionsfaktoren oder ähnliches handeln, die den Expressionslevel der genannten Proteine regulieren.

Zur Steigerung der Aktivität der beschriebenen Proteine, vor allem der Ubiquitin-Isopeptidase T, von FABP-3, SAP, Galektin, Mikroseminoprotein beta, HSP27 und Transgelin, kann beispielsweise eine Komponente eingesetzt werden, die eine vergleichbare oder ähnliche enzymatische Aktivität entwickelt. Weiterhin kann durch einen entsprechenden Wirkstoff die Aktivität der bereits vorhandenen Enzymmoleküle induziert oder gesteigert werden. Andererseits ist es auch möglich, mit geeigneten Wirkstoffen die Expression, also die Synthese, entsprechender enzymatischer Moleküle zu induzieren oder zu steigern. Hierbei kann der Wirkstoff beispielsweise auch an bestimmten Vorläufermolekülen, Regulatoren, Aktivatoren oder Inhibitoren der jeweiligen Enzyme angreifen.

Weiterhin können auch Hormone oder ähnlich wirksame Substanzen als Wirkstoffe eingesetzt werden, wenn sie die Aktivität des jeweiligen Proteins in gewünschter Weise beeinflussen. So können beispielsweise Progesteron-Analoga eingesetzt werden, um die mitochondriale Enoyl-Coenzym A-Hydratase zu hemmen.

Durch die erfindungsgemäße Verwendung eines Wirkstoffs zur Behandlung von Krebs wird vorteilhafterweise erreicht, daß die Entwicklung o-

der das Wachstum eines Tumors vermindert oder gehemmt wird, und/oder daß eine Metastasierung von Tumoren zumindest teilweise verhindert oder vollständig vermieden wird.

- 5 Weiterhin umfaßt die Erfindung eine pharmazeutische Zusammensetzung, die mindestens einen Wirkstoff gemäß der obigen Beschreibung sowie mindestens einen pharmazeutisch akzeptablen Träger aufweist. Bezüglich Einzelheiten zu dieser pharmazeutischen Zusammensetzung bzw. zu dem Wirkstoff wird auf die obige Beschreibung verwiesen. Ge-
10 eignete pharmazeutisch akzeptable Träger erschließen sich dem Fachmann.

- Schließlich umfaßt die Erfindung auch ein Verfahren zur Behandlung von Krebserkrankungen, beispielsweise von Prostatakrebs, wobei min-
15 destens einer der beschriebenen Wirkstoffe verabreicht wird. Bezüglich weiterer Merkmale dieses Behandlungsverfahrens wird auf die obige Beschreibung verwiesen.

- Die Verabreichung des Wirkstoffs kann auf verschiedene Weise erfol-
20 gen, beispielsweise oral, intravenös, topisch oder per Inhalation. Entsprechende Formulierungen sind dem Fachmann geläufig. Die Verabreichungsform hängt vor allem von der zu behandelnden Krankheit sowie natürlich auch von der Konstitution des Patienten ab. Näheres hierzu erschließt sich dem Fachmann.

- 25 Die beschriebenen Merkmale und weitere Merkmale der Erfindung erschließen sich aus der folgenden Beschreibung von bevorzugten Ausführungsformen in Verbindung mit den Unteransprüchen und den Figuren. Hierbei können die einzelnen Merkmale jeweils für sich oder in
30 Kombination miteinander verwirklicht sein.

In den Abbildungen zeigen:

Fig. 1: Darstellung eines zweidimensionalen Polyacrylamidgels mit aufgetrennten Proteinen. Die isoelektrische Fokussierung erfolgte bei pH 4-7. Die mit Zahlen markierten Proteinspots zeigen diejenigen Proteine, die abweichende Abundanz in Krebsgewebe und Kontrollgewebe zeigen. Die Numerierung entspricht der Tabelle 1.

Fig. 2: Darstellung eines zweidimensionalen Polyacrylamidgels mit aufgetrennten Proteinen. Die isoelektrische Fokussierung erfolgte bei pH 6-11. Die mit Zahlen markierten Proteinspots zeigen diejenigen Proteine, die abweichende Abundanz in Krebsgewebe und Kontrollgewebe zeigen. Die Numerierung entspricht der Tabelle 1.

Beispiele

Zur Identifizierung von erfindungsgemäß relevanten Proteinen wurden insgesamt Gewebeproben von 23 Patienten untersucht. Krebsgewebe und Kontrollgewebe wurde jeweils aufbereitet und einer zweidimensionalen Polyacrylamid-Gelelektrophorese (2D-PAGE) unterzogen. Die isoelektrische Fokussierung erfolgte bei pH 4-7 und pH 6-11. Die gelelektrophoretischen Ergebnisse von zwei Patienten waren für eine weitere Analyse ungeeignet. Bei weiteren zwei Patienten ergaben die Ergebnisse bei pH 6-11 unbefriedigende Resultate. Insgesamt konnten also die Ergebnisse von 21 Patienten im pH-Bereich von 4-7 und die Ergebnisse von 19 Patienten im pH-Bereich von 6-11 ausgewertet werden.

Die beiden verschiedenen Proben jedes Patienten wurden mit jeweils unterschiedlichen Isotopen markiert, gemischt und auf einem einzigen zweidimensionalen Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Die

Signale jedes Isotops wurden anschließend getrennt voneinander detektiert, so daß die Proteinmuster der beiden Gewebeproben unmittelbar miteinander verglichen werden konnten.

- 5 Zur letztendlichen Identifizierung der Proteine wurden analytische Mengen ($< 1 \mu\text{g}$) der radiomarkierten Proteine mit präparativen Mengen ($> 200 \mu\text{g}$) der Proteine der selben Probe zusammen in präparativen Anreicherungsgelele aufgetrennt. Die interessanten Proteinspots wurden aus silbergefärbten präparativen Gelen ausgeschnitten, tryptisch verdaut und durch *matrix assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry* (MALDI-TOF MS) identifiziert (Bruker BiFlex oder Ultra-Flex). Teilweise wurde eine *electrospray ionization ion trap mass spectrometry* (ESI-MS) durchgeführt (Bruker Esquire).
- 10
- 15 Auf diese Weise wurden 19 Proteine eindeutig identifiziert, die in übereinstimmender Weise eine erhöhte oder eine erniedrigte Abundanz in Krebsgewebe im Vergleich mit Kontrollgewebe aufwiesen.

- Bei den Analysen wurden z.T. bestimmte Patientengruppen gebildet, innerhalb derer die Abundanzen der verschiedenen Proteine untersucht wurden. Bei dieser sogenannten Cluster-Analyse (Clustan Graphics 6.4) wurden drei Gruppen von Patienten bestimmt, die jeweils charakteristische Proteinexpressionsmuster zeigten. Mit Hilfe dieser Vorgehensweise wurden die Proteine Annexin A3, Transgelin, Triosephosphat-Isomerase und Aldolase A identifiziert, die für bestimmte Patientengruppen charakteristische Abundanzen zeigten.
- 20
- 25

Gewebeproben

30

Benignes und malignes Prostatagewebe wurde von Patienten, die zuvor einer Prostatektomie unterzogen worden waren, erhalten. Die Patienten

wurden mit Hilfe des PSA- (prostata specific antigen) Screening untersucht, und die Tumore wurden mit Ultraschall bestätigt. Eine Einwilligung jedes Patienten wurde vor Durchführung der Operation eingeholt.

- 5 Sofort nach Entnahme der Prostata wurde diese in eine sterile Box überführt und dort gekühlt. Es wurden 0,5 - 1 cm dicke Gewebeschnitte angefertigt, die in eine linke und eine rechte Hälfte unterteilt wurden. Diese wurden in eine *freezing matrix* eingebettet und schockgefroren. Der Rest der Prostata wurde in Formalin fixiert und gemäß üblichen Standardverfahren weiterbehandelt. Zur Herstellung von Gewebeproben wurden
- 10 dünne Sektionen von beiden Seiten der Prostata entnommen und mit Hämatoxylin-Eosin angefärbt. Diese Schnitte wurden bis zur Verwendung bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Kontrollgewebeproben wurden aus nicht-tumorbefallenen Regionen entnommen und einer identischen Behandlung
- 15 unterzogen.

Probenaufbereitung

- 20 Die Proteine wurden in 100 μl kochendem 2 % SDS, 0,1 M Tris, pH 8,8 lysiert und die Proteinkonzentration anhand der *Bicinchoninic acid*-Methode (BCA) bestimmt.

- Die Iodierung mit I-125 bzw. I-131, die zweidimensionale Polyacrylamid-Gelelektrophorese sowie die Datenanalyse wurde nach herkömmlichen Verfahren durchgeführt (Cahill et al., 2003, Rapid Communications in Mass Spectrometry 17: 1283-1290). Radioaktives Iod stammte von Amersham Bioscience (Freiburg). Die Proteiniodierungsreaktionen entweder mit I-125 oder I-131 wurden jeweils separat mit identischen Iod-
- 25
- 30 konzentrationen durchgeführt.

Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Für den Auftrag auf die Polyacrylamidgele wurden identische Proteinmengen der markierten Proben (Krebsgewebe und Kontrollgewebe) miteinander gemischt. Für die isoelektrische Fokussierung (IEF) über die pH-Bereiche 4-7 und 6-11 wurden die Proben in einem üblichen Probenpuffer auf 18 cm immobilisierte pH-Gradienten (IPG)-Streifen (Amersham Bioscience) geladen. IEF als erste Dimension der 2D-PAGE-Proteinauftrennung wurde auf einer Multiphor-Apparatur (Amersham Bioscience) durchgeführt. Die zweite Dimension (SDS-PAGE) wurde auf einer ISO-DALT-Apparatur (Höfer) durchgeführt. Die Gele wurden getrocknet, auf einen 80 µm Plastikfilm laminiert, und anschließend wurde die radioaktive Messung der Signale von beiden Radioisotopen vorgenommen.

Durch die gewählte Analyse der verschiedenen Radioisotope konnte eine quantitative, mehrfarbige differentielle Darstellung der Proteine der verschiedenen Proben erreicht werden. Daher konnte ein direkter Vergleich der integrierten Proteinspotintensitäten der beiden Proben, die auf einem Gel aufgetrennt waren, für die weitere Analyse verwendet werden. Die Analyse auf einem Gel hat den Vorteil, daß Variationen zwischen zwei oder mehr Gelen nicht ins Gewicht fallen. Die größte potentielle Fehlerquelle ist eine unterschiedliche stöchiometrische Markierung mit dem einen oder dem anderen Isotop. Dies wurde durch die Herstellung von Gelen mit jeweils umgekehrten Markierungen ausgeschlossen. Das heißt also, daß die Kontrollprobe und die Krebsgewebeprobe jeweils mit dem einen und auch mit dem anderen Isotop markiert wurden und jeweils invers miteinander verglichen wurden. Da die Proteinmuster der jeweils inversen Markierungsprozeduren übereinstimmten, waren die qualitativen Kriterien erfüllt. Mit Hilfe von computergestützten Vorgehensweisen wurden die verschiedenen Isotopsignale jeweils in einer anderen Farbe (blau bzw. orange) sichtbar gemacht, so daß konsistente

Unterschiede in der Abundanz zwischen den Proben jeweils in der einen bzw. anderen Farbe je nach gewählter Isotopenmarkierung erschien. Näheres zu dieser Vorgehensweise ergibt sich aus Cahill et al., 2003, Rapid Communications in Mass Spectrometry 17: 1283-1290.

5

Bildanalyse

10 Die differentielle Proteinexpressionsanalyse basiert auf der zuverlässigen differentiellen Quantifizierung der Proteinspots auf den beschriebenen Polyacrylamidgelen. Für eine quantitative Bildanalyse wurde die Phoretix 2D Advanced software (Nonlinear Dynamics) angewendet, wobei eigene Anpassungen vorgenommen wurden.

15

Proteinidentifizierung durch Massenspektrometrie

Es wurden im Prinzip zwei massenspektrometrische Methoden eingesetzt. Zum einen die sehr schnelle und zuverlässige Identifizierung von
20 hoch abundanten Proteinen durch *peptide mass fingerprinting* mit MALDI-TOF MS. Die Identifizierung von sehr niedrig abundanten Proteinen wurde mit der zeitaufwendigeren LC-ESI-IonTrap-MS/MS oder MALDI-TOF-TOF Methode durchgeführt. Zusammengefaßt wurden Gelstücke der ausgewählten Proteinspots ausgeschnitten und die Prote-
25 ine in diesen Gelstücken mit Hilfe von Trypsin verdaut. Die resultierende Lösung wurde zunächst mit der *peptide mass fingerprint*-Prozedur basierend auf MALDI-TOF-MS analysiert. Für die Proteinspots, für die auf diese Weise keine eindeutige Identifikation möglich war, wurde die langsamere Fragmentationenanalyse, basierend auf MALDI-TOF-TOF oder
30 LC-ESI-IonTrap-MS/MS zusätzlich durchgeführt. Eine genaue Beschreibung dieser Methoden ist Vogt et al., 2003, Rapid Communication in

Mass Spectrometry 17: 1273-1282 und Vogt et al., 2003, Molecular Cellular Proteomics 2: 795 zu entnehmen.

5 Identifizierung der Proteine

Zur Identifizierung der Proteine wurden die Peptidmassen, die durch die Massenspektrometrie gewonnen wurden, gegenüber der NCBI-Proteindatenbank ausgewertet. Dies wurde mit Hilfe des Programms
10 MASCOT Version 1.9 (Matrix Science, London, UK) durchgeführt.

Quantitative Bildanalyse

15 Quantitative Analysen wurden mit Hilfe der digitalen Daten durchgeführt, die mit einem Photomultiplier eines Radio-Imagers für jeden Pixel der Bildmatrix aufgezeichnet wurden. Die Proteinspotgrenzen wurden mit Hilfe der Software Phoretix 2D Advanced (Nonlinear Dynamics) definiert und die Pixelwerte innerhalb der Spotregion nach Subtraktion eines geeigneten Hintergrundsignals integriert. Basierend auf den kompletten
20 Daten, die generiert wurden, wurde eine detaillierte Quantifizierung der detektierten Proteinspots durchgeführt. Die Tabelle 1 enthält eine Zusammenfassung dieser Ergebnisse.

25 Die Figuren 1 und 2 zeigen jeweils die Positionen der ausgewählten Proteinspots, einmal bei isoelektrischer Fokussierung bei pH 4-7 (Fig. 1) und im anderen Fall bei pH 6-11 (Fig. 2).

Patentansprüche

1. Verwendung des Proteins Ubiquitin-Isopeptidase T und/oder Protein-Disulfid-Isomerase (PDI) als diagnostischer Marker für Krebs.
2. Verwendung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß eine Herabregulation der Ubiquitin-Isopeptidase T und/oder eine Heraufregulation der Protein-Disulfid-Isomerase (PDI) im Vergleich mit Kontrollen untersucht wird.
3. Verwendung des Proteins mitochondriale Enoyl-Coenzym A-Hydratase, Fettsäure-bindendes Protein 3 (FABP-3) und/oder epidermales Fettsäure-bindendes Protein (E-FABP) als diagnostischer Marker für Krebs.
4. Verwendung nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß eine Heraufregulation der mitochondrialen Enoyl-Coenzym A-Hydratase und/oder des epidermalen Fettsäure-bindenden Proteins (E-FABP) und/oder eine Herabregulation des Fettsäure-bindenden Proteins 3 (FABP-3) im Vergleich mit Kontrollen untersucht wird.
5. Verwendung des Proteins Serum-Amyloid P-Komponente (SAP) als diagnostischer Marker für Krebs.
6. Verwendung nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß eine Herabregulation der Serum-Amyloid P-Komponente (SAP) im Vergleich mit Kontrollen untersucht wird.
7. Verwendung des Proteins 14-3-3 Protein tau als diagnostischer Marker für Krebs.

8. Verwendung nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß eine Heraufregulation des 14-3-3 Proteins tau im Vergleich mit Kontrollen untersucht wird.
9. Verwendung des Proteins nukleäres Chloridionenkanal-Protein als diagnostischer Marker für Krebs.
10. Verwendung nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß eine Heraufregulation des nukleären Chloridionenkanal-Proteins im Vergleich mit Kontrollen untersucht wird.
11. Verwendung des Proteins Annexin, insbesondere Annexin A3, als diagnostischer Marker für Krebs.
12. Verwendung nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass eine Heraufregulation des Annexins, insbesondere von Annexin A3, im Vergleich mit Kontrollen untersucht wird.
13. Verwendung von mindestens einem Protein, das ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Ubiquitin-Isopeptidase T, Serum-Amyloid P-Komponente (SAP), Fettsäure-bindendes Protein 3 (FABP-3), Galektin, Mikrosemipoprotein beta, Hitzeschockprotein 27 (HSP27), 14-3-3 Protein beta, 14-3-3 Protein zeta, nukleäres Chloridionenkanal-Protein, 14-3-3 Protein tau, Hitzeschockprotein 90 (HSP90), Protein-Disulfid-Isomerase (PDI), epidermales Fettsäure-bindendes Protein (E-FABP), mitochondriale Enoyl-Coenzym A-Hydratase, Nucleophosmin, Annexin, insbesondere Annexin A3, Transgelin, Triosephosphat-Isomerase und Aldolase A als diagnostischer Marker für Krebs.

14. Verwendung nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß eine Herabregulation von mindestens einem Protein, das ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Ubiquitin-Isopeptidase T, Serum-Amyloid P-Komponente (SAP), Fettsäure-bindendes Protein 3 (FABP-3), Galektin, Mikroseminalprotein beta, Hitzeschockprotein 27 (HSP27) und Transgelin im Vergleich mit Kontrollen untersucht wird.
15. Verwendung nach Anspruch 13 oder Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, daß eine Heraufregulation von mindestens einem Protein, das ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus 14-3-3 Protein beta, 14-3-3 Protein zeta, nukleäres Chloridionenkanal-Protein, 14-3-3 Protein tau, Hitzeschockprotein 90 (HSP90), Protein-Disulfid-Isomerase (PDI), epidermales Fettsäure-bindendes Protein (E-FABP), mitochondriale Enoyl-Coenzym A-Hydratase, Nucleophosmin, Annexin, insbesondere Annexin A3, Triosephosphat-Isomerase und Aldolase A im Vergleich mit Kontrollen untersucht wird.
16. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß der Krebs Prostatakrebs ist.
17. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß das mindestens ein Protein mit Hilfe von Polyacrylamid-Gelelektrophorese, insbesondere zweidimensionaler Gelelektrophorese, Massenspektrometrie, Antikörpern und/oder Oligonukleotiden, insbesondere Polymerasekettenreaktion (PCR), nachgewiesen wird.
18. Diagnosekit, umfassend mindestens eine Substanz zum Nachweis der Aktivität und/oder Expression von mindestens einem Protein, das ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus U-

biquitin-Isopeptidase T, Serum-Amyloid P-Komponente (SAP), Fettsäure-bindendes Protein 3 (FABP-3), Galektin, Mikrosemipoprotein beta, Hitzeschockprotein 27 (HSP27), 14-3-3 Protein beta, 14-3-3 Protein zeta, nukleäres Chloridionenkanal-Protein, 14-3-3 Protein tau, Hitzeschockprotein 90 (HSP90), Protein-Disulfid-Isomerase (PDI), epidermales Fettsäure-bindendes Protein (E-FABP), mitochondriale Enoyl-Coenzym A-Hydratase, Nucleophosmin, Annexin, insbesondere Annexin A3, Transgelin, Triosephosphat-Isomerase und Aldolase A zur Erkennung von Krebserkrankungen, insbesondere von Prostatakrebs.

19. Verwendung von mindestens einem Wirkstoff, der die Aktivität und/oder Expression des Proteins Ubiquitin-Isopeptidase T und/ oder Protein-Disulfid-Isomerase (PDI) beeinflusst, zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung von Krebs.
20. Verwendung nach Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, daß der Wirkstoff die Aktivität und/oder Expression der Ubiquitin-Isopeptidase T steigert.
21. Verwendung nach Anspruch 19 oder Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, daß der Wirkstoff die Aktivität und/oder Expression der Protein-Disulfid-Isomerase (PDI) hemmt.
22. Verwendung von mindestens einem Wirkstoff, der die Aktivität und/oder Expression des Proteins mitochondriale Enoyl-Coenzym A-Hydratase, Fettsäure-bindendes Protein 3 (FABP-3) und/oder epidermales Fettsäure-bindendes Protein (E-FABP) beeinflusst, zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung von Krebs.

23. Verwendung nach Anspruch 22, dadurch gekennzeichnet, daß der Wirkstoff die Aktivität und/oder Expression der mitochondrialen Enoyl-Coenzym A-Hydratase und/oder des epidermalen Fettsäure-bindenden Proteins (E-FABP) hemmt.
24. Verwendung nach Anspruch 22 oder Anspruch 23, dadurch gekennzeichnet, daß der Wirkstoff die Aktivität und/oder Expression des Fettsäure-bindenden Proteins 3 (FABP-3) steigert.
25. Verwendung von mindestens einem Wirkstoff, der die Aktivität und/oder Expression des Proteins Serum-Amyloid P-Komponente (SAP) beeinflusst, insbesondere steigert, zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung von Krebs.
26. Verwendung von mindestens einem Wirkstoff, der die Aktivität und/oder Expression des Proteins 14-3-3 Protein tau beeinflusst, insbesondere hemmt, zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung von Krebs.
27. Verwendung von mindestens einem Wirkstoff, der die Aktivität und/oder Expression des Proteins nukleäres Chloridionenkanal-Protein beeinflusst, insbesondere hemmt, zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung von Krebs.
28. Verwendung von mindestens einem Wirkstoff, der die Aktivität und/oder Expression des Proteins Annexin, insbesondere Annexin A3, beeinflusst, insbesondere hemmt, zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung von Krebs.
29. Verwendung von mindestens einem Wirkstoff, der die Aktivität und/oder Expression von mindestens einem Protein, das ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Ubiquitin-

Isopeptidase T, Serum-Amyloid P-Komponente (SAP), Fettsäure-bindendes Protein 3 (FABP-3), Galektin, Mikrosemipoprotein beta, Hitzeschockprotein 27 (HSP27) und Transgelin beeinflusst, insbesondere steigert, zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung von Krebs.

30. Verwendung von mindestens einem Wirkstoff, der die Aktivität und/oder Expression von mindestens einem Protein, das ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus 14-3-3 Protein beta, 14-3-3 Protein zeta, nukleäres Chloridionenkanal-Protein, 14-3-3 Protein tau, Hitzeschockprotein 90 (HSP90), Protein-Disulfid-Isomerase (PDI), epidermales Fettsäure-bindendes Protein (E-FABP), mitochondriale Enoyl-Coenzym A-Hydratase, Nucleophosmin, Annexin, insbesondere Annexin A3, Triosephosphat-Isomerase und Aldolase A beeinflusst, insbesondere hemmt, zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung von Krebs.
31. Verwendung nach einem der Ansprüche 19 bis 30, dadurch gekennzeichnet, daß der Krebs Prostatakrebs ist.
32. Verwendung nach einem der Ansprüche 19 bis 31, dadurch gekennzeichnet, daß der Wirkstoff ein Agonist, Antagonist, Antikörper, eine *deficient*-Mutante, eine *dominant-negative*-Mutante und/ oder ein *antisense*-Molekül ist.
33. Pharmazeutische Zusammensetzung, umfassend mindestens einen Wirkstoff gemäß einem der Ansprüche 19 bis 32 sowie mindestens einen pharmazeutisch akzeptablen Träger.

Zusammenfassung

Es wird die Verwendung verschiedener Proteine als diagnostische Marker für Krebserkrankungen bereitgestellt. Besonders bevorzugt ist die Verwendung des Proteins Ubiquitin-Isopeptidase T und/oder des Proteins Protein-Disulfid-Isomerase (PDI). Bevorzugterweise wird hierbei eine Herabregulation der Ubiquitin-Isopeptidase T und/oder eine Heraufregulation der PDI im Vergleich mit Kontrollen untersucht. Weiterhin wird die Verwendung von Wirkstoffen zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung von Krebs beschrieben, wobei diese Wirkstoffe die Aktivität und/oder die Expression verschiedener charakteristischer Proteine beeinflussen.

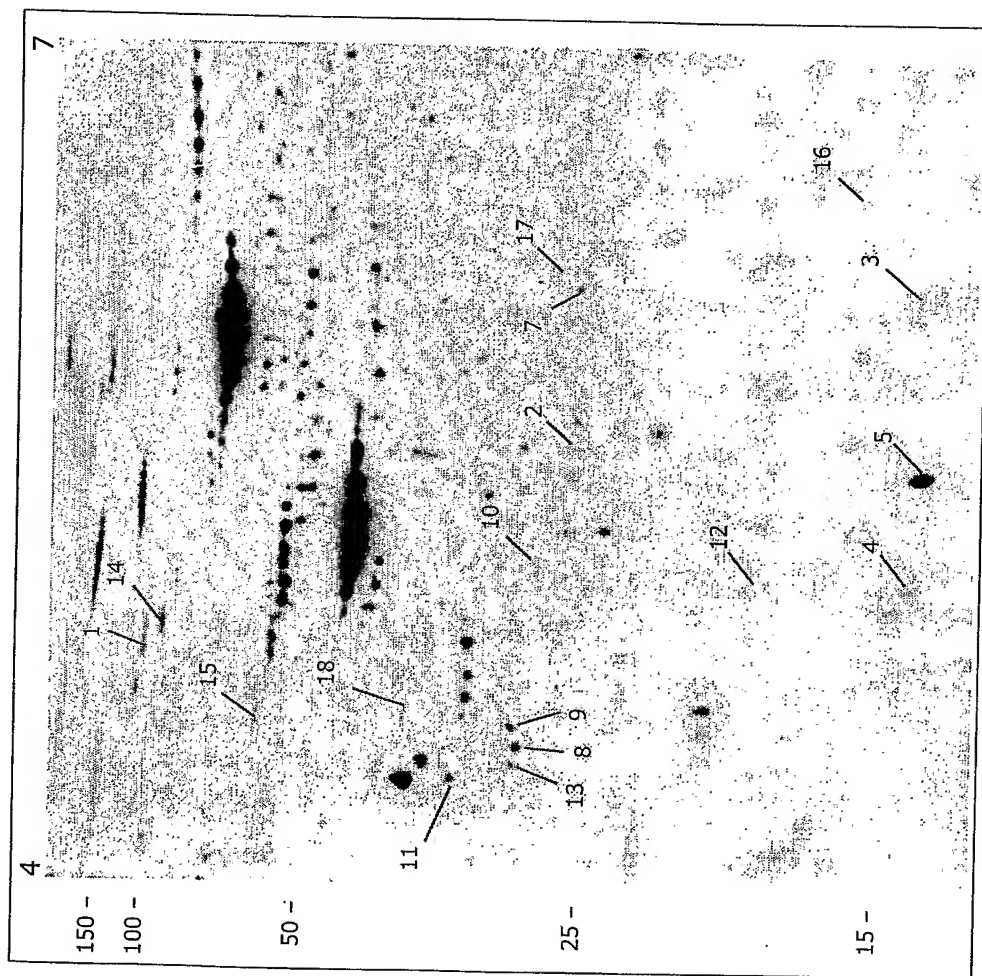


Fig. 1

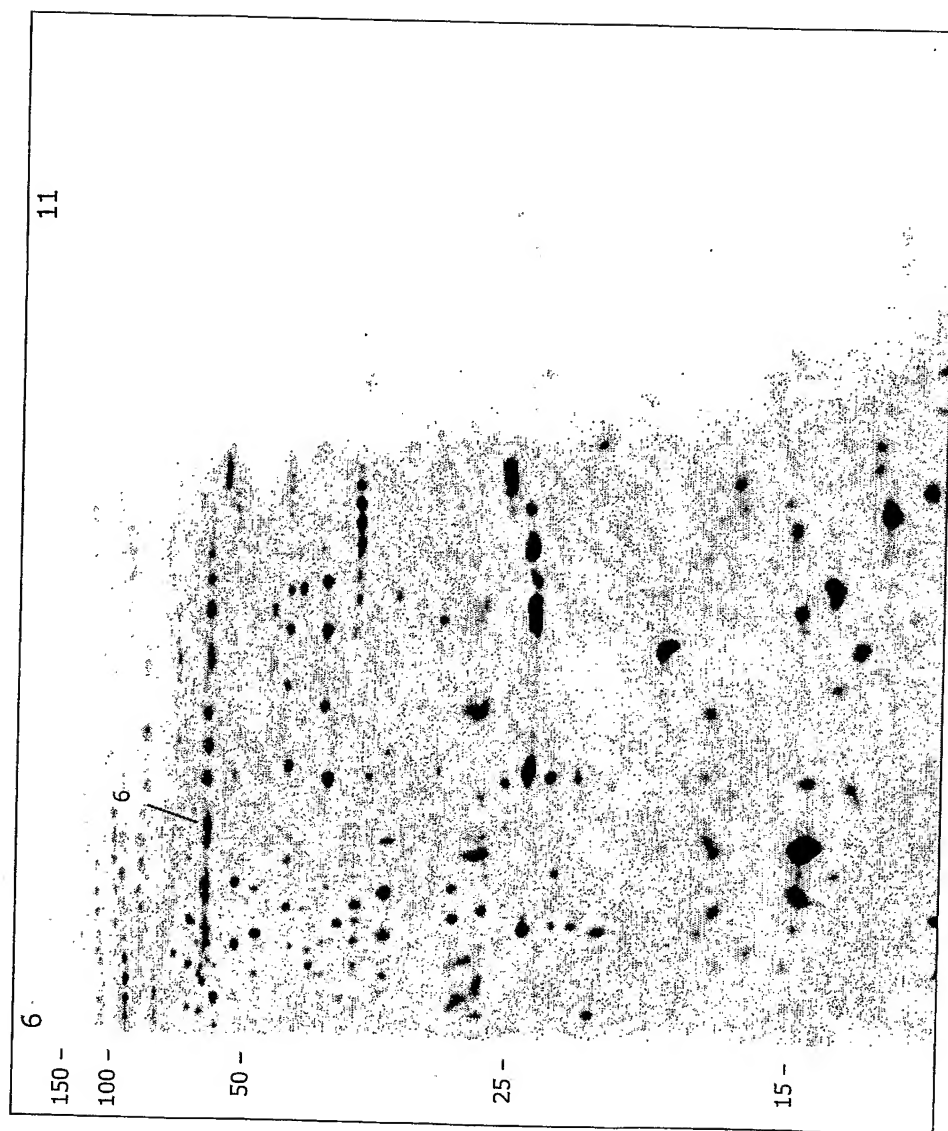


Fig. 2